

- 1 -

"Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie".

La présente invention a pour objet une nouvelle métalloprotéase membranaire appelée NEP II et son utilisation, notamment pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie.

5 Les métalloprotéases membranaires telles que la néprilysine (NEP I, EC 3.4.24.11) jouent un rôle important dans l'activation ou l'inactivation des messagers peptidiques neuronaux ou hormonaux. Leur inhibition sélective par des composés synthétiques a déjà conduit à des médicaments couramment utilisés en thérapeutique ou en cours de développement clinique,
10 notamment dans les domaines gastroentérologique (Baumer et coll., Gut, 1992, 33 : 753-758) et cardiovasculaire (Gros et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88 : 4210-4214). L'isolement des ADNc de gènes de nouvelles métalloprotéases apparentées est de nature à permettre le développement de nouvelles classes d'inhibiteurs spécifiques à applications thérapeutiques
15 prometteuses. C'est ainsi que le clonage et l'expression du gène de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Xu et coll., Cell, 1994, 78 : 473-485) a permis la mise au point d'inhibiteurs potentiellement utiles dans certaines affections cardiovasculaires.

20 Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle métalloprotéase membranaire appartenant à la famille ECE/NEP/Kell (Lee S. et coll., 1991, PNAS 88(14):6353-57), qu'ils ont appelée NEP II.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi la séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ou un fragment biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ledit polypeptide isolé étant désigné par «NEP II».

30 La séquence SEQ ID n° 2 est la séquence d'acides aminés de NEP II identifiée chez le rat.

La séquence SEQ ID n° 4 est une séquence (partielle) d'acides aminés de NEP II identifiée chez l'homme.

Par polypeptide "dérivé", on entend tout polypeptide résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4, c'est-à-dire par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'au moins un acide aminé, ou toute isoforme ayant une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 mais contenant au moins un acide aminé sous la forme D.

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe, tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique), d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, lalanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Par polypeptide "homologue", on entend plus particulièrement tout polypeptide isolable chez d'autres espèces de mammifères que le rat ou l'homme.

Lesdits polypeptides homologues présentent préférentiellement une homologie de séquence supérieure à 70 %, de préférence encore supérieure à 75 %, avec la séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 complète, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie dudit polypeptide, contenant le site actif.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (i.e. identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des

deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

Lesdits polypeptides dérivés, homologues ou les fragments polypeptidiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 sont biologiquement actifs, c'est-à-dire présentent des propriétés biologiques identiques ou similaires des propriétés biologiques du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4, à savoir une activité métalloprotéasique.

Les fragments polypeptidiques préférés comprennent la 10 séquence du site actif responsable de la liaison de l'atome de zinc indispensable à la catalyse. Ce site actif a été identifié comme englobant les résidus HEX₁X₂H, X₁ et X₂ représentant des acides aminés variables. Il s'agit en particulier de la séquence HEITH (acides aminés 608 à 612 de la séquence SEQ ID n° 2) dans le polypeptide NEP II chez le rat et l'homme.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, ou leurs séquences complémentaires.

La séquence SEQ ID n° 1 est la séquence d'ADNc comprenant la 20 phase codante pour NEP II identifiée chez le rat.

La séquence SEQ ID n° 3 est la séquence d'ADNc comprenant (partiellement) la phase codante pour NEP II identifiée chez l'homme.

Par séquence nucléotidique "dérivée", on entend toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide dérivé de NEP II tel que défini 25 précédemment, c'est-à-dire une séquence résultant d'une modification de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, notamment par mutation, délétion, addition ou substitution d'au moins un nucléotide. Sont en particulier comprises les séquences dérivées de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3 par dégénérescence du code génétique.

Par séquence "homologue", on entend plus particulièrement 30 toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide NEP II homologue

du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 4 chez d'autres espèces de mammifères que le rat ou l'homme.

Une telle séquence homologue présente préférentiellement une homologie supérieure à 70 %, de préférence encore supérieure à 75 %, avec la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 3, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie centrale de la séquence codant pour le polypeptide NEP II.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID n° 1 ou n° 3, dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m):

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m=81,5+0,41(\%G+C)+16,6\log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) -(600/\text{nombre de bases})$ (Sambrook et al, Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m= 4(G+C) + 2(A+T)$.

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 15°C en dessous de T_m , de préférence encore de 5 à 10°C en dessous de T_m (forte stringence), et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour la production d'une protéine recombinante NEP II selon l'invention, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

Un système efficace de production d'une protéine recombinante nécessite de disposer d'un vecteur, par exemple d'origine plasmidique ou virale, et d'une cellule hôte compatible.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple des levures, des cellules d'insectes, de mammifères, telles que les cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible.

Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que les régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être intégré dans la cellule et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réPLICATION AUTONOME au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Des exemples de vecteurs d'intérêt sont les plasmides pcDNA 3.1, PCR2.1 (Invitrogen), ou pMbac (Stratagene).

L'invention vise les vecteurs de clonage et/ou d'expression contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, et vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réPLICATION ET/OU L'EXPRESSION DE LA SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE TRANSFECTÉE.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant selon l'invention.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante est elle-même comprise dans la présente invention, et se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées séparément ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de sérum polyclonal, etc.

La présente invention a également pour objet les sondes nucléotidiques, capables de s'hybrider fortement et spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, d'un ADN génomique ou d'un ARN messager codant pour un polypeptide selon l'invention. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier (Sambrook et al., 1989), de préférence à des conditions de forte stringence, c'est-à-dire des conditions de température comprises entre (T_m moins 5° C) et (T_m moins 15° C) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre T_m et (T_m moins 10° C) (forte stringence).

Les sondes préférées sont notamment les sondes oligonucléotidiques choisies parmi les séquences SEQ ID n°5 à SEQ ID n°27.

De telles sondes sont utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction en chaîne par polymérase) ou toute autre variante de celle-ci.

De telles sondes sont également utiles dans un procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :

- préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;
- mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon l'invention, ladite sonde pouvant être notamment une sonde oligonucléotidique de séquence SEQ ID n° 5 à SEQ ID n° 27 ;
- détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.

10

L'invention a également pour objet les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon l'invention administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention. L'invention a en outre pour objet l'utilisation de ces anticorps pour la purification ou la détection d'un polypeptide NEP II dans un échantillon biologique.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre la protéine NEP II, produite par exemple par recombinaison génétique suivant la méthode décrite ci-dessus, selon les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, vol. 256, pp 495-497).

Les anticorps peuvent être des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')2. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués.

Les anticorps selon l'invention sont particulièrement utiles pour détecter la présence de NEP II.

La présente invention a donc pour objet un procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon l'invention ;

- détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

Par "anticorps détectable", on entend soit un anticorps marqué par un groupement détectable, tel qu'un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc., soit un anticorps auquel se lie un autre anticorps lui-même marqué de manière détectable.

Les anticorps selon l'invention peuvent ainsi permettre d'évaluer une surexpression du polypeptide II, qui peut être indicatrice de cellules tumorales neuroendocriniennes notamment.

L'invention a également pour objet un procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II tel que défini précédemment, dans lequel on met en contact lesdits composés, éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés substrats.

De tels substrats spécifiques de NEP II peuvent être en particulier utilisés dans un procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon l'invention, ledit composé substrat étant éventuellement marqué ;

- évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

Les cellules susceptibles d'être ainsi testées sont notamment les cellules transfectées par un polynucléotide codant pour le polypeptide NEP II tel que défini précédemment. Les extraits tissulaires susceptibles d'être testés sont en particulier les membranes de testicule, particulièrement riches en

métalloprotéase NEP II.

L'invention a par ailleurs pour objet un procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide NEP II selon l'invention, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

Les composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique de NEP II sont de préférence des peptides courts de 2 ou 3 acides aminés naturels ou modifiés.

Les peptides synthétiques identifiés comme inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II par ce procédé de criblage peuvent être couplés à un groupe chélateur de zinc tels que les groupes thiol, phosphate ou acide hydroxamique, selon les techniques classiques connues de l'homme du métier. Le composé inhibiteur obtenu est un bon candidat en tant que principe actif d'un médicament, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ledit groupe chélateur peut éventuellement être protégé de manière transitoire, par exemple par un ester de thiol, pour améliorer la biodisponibilité dudit principe actif.

Le polypeptide NEP II selon l'invention est particulièrement utile pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.

Parmi les troubles en cause, on peut citer notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affections endocriniennes. Sont plus particulièrement visés les troubles affectant le métabolisme des neurohormones ou facteurs de la sphère corticotrope.

Les composés substrats de NEP II ou inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenus selon les procédés décrits précédemment peuvent également être utiles pour détecter la protéine NEP II.

La présente invention a donc également pour objet un procédé de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu tel que défini précédemment ou avec un composé inhibiteur de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage tel que défini précédemment, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué;

- détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

Par "composé substrat marqué" ou "inhibiteur marqué", on entend un composé substrat ou un composé inhibiteur marqué de manière détectable, par exemple par un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

EXAMPLE 1:

Clonage de l'ADNc codant pour NEP II chez le rat

Des oligonucléotides dégénérés ont été obtenus à partir de l'alignement des séquences peptidiques des enzymes ECE, NEP I et Kell et de la délimitation des zones de forte homologie.

L'ARN total de différents tissus de rat (cerveau, intestin et testicules) a été soumis à une transcription inverse (RT) et amplifié par réaction en chaîne à la polymérase (PCR), à l'aide d'une paire d'oligonucléotides dégénérés sur la région N-terminale riche en résidus cystéine :

Les séquences de ces oligonucléotides dégénérés sont les suivantes :

DCYS2 CCC AAG (G/T)CG (A/G)G(A/G) CTG GTC

5 DCYS3 T(A/T)(C/T) GC(A/C/T/G) GG(A/T) GG(A/C) TGG

Ceci a permis d'amplifier un fragment de 420 paires de bases à partir de l'ARNr de testicule codant pour une phase ouverte de lecture qui présente une homologie de 76% avec la protéine NEP I. Cette séquence a été complétée par 3' et 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends), à partir 10 d'ARNt de cerveau de testicules. Les séquences ont été confirmées par la vérification de cinq clones différents pour chaque tissu et chaque amplification. L'ADNc complet (SEQ ID n° 1) a alors été cloné dans les vecteurs PCR2.1 et pcDNA3.1 (Invitrogen).

15

EXEMPLE 2 :

Caractéristiques du polypeptide NEP II de rat

Le nouveau gène isolé code pour une protéine de 774 acides 20 aminés (SEQ ID n° 2) qui, outre de fortes homologies avec les enzymes NEP I, ECE et Kell (52%, 40% et 28% d'identité en acides aminés, respectivement) possède la séquence consensus du site actif HEXXH, une région transmembranaire (acides aminés 24 à 40 sur la séquence SEQ ID n° 2) suivie de quatre résidus cystéine caractéristiques de cette famille, et sept sites 25 potentiels de glycosylation. Trois épissages alternatifs ont été identifiés par séquençage des RACE et par RT-PCR. Un de ces épissages alternatifs élimine un site potentiel de glycosylation et pourrait affecter le transit de la protéine à la surface de la cellule ou son activité. Chaque épissage correspond par ailleurs à un exon de la NEP I, ce qui suggère une structure de 30 gène similaire. Ces données démontrent une appartenance de cette nouvelle enzyme à la famille des métalloprotéases ECE/NEP/Kell. Son homologie marquante avec NEP I a conduit à la nommer NEP II.

EXEMPLE 3 :**Clonage de l'ADNc codant pour NEP II chez l'homme**

5 Afin de cloner l'homologue humain de NEP II, deux oligonucléotides ont été conçus, basés sur la séquence protéique de NEP II de rat. Les séquences ont été choisies d'une part pour leur faible dégénérescence (comme par exemple un tryptophane, représenté par un seul codon dans le code génétique) et d'autre part pour leur degré de conservation
10 (comme le site de liaison du zinc).

1- (H)EITHFD (SEQ ID n°28) ou 5' - CGA GAT CAC ACA TGG CTT TGA
TGA - 3' (S) (SEQ ID n°22)

2- QVWCGS (SEQ ID n°29) ou 5'- GGA CCC ACA CCA CAC CTG - 3' (AS)
(SEQ ID n°23)

15 Une réaction en chaîne à la polymérase a été effectuée sur de l'ADNc d'hippocampe humain obtenu à partir d'une banque (Stratagene), et une bande de 330 pb a été amplifiée, sous-clonée et séquencée (SEQ ID n°3). La séquence obtenue présente une homologie de séquence de 82 % avec la NEPII de rat, ce qui permet d'affirmer qu'elle code pour l'homologue humain.

20 La présence du site de liaison du zinc HEITH a été confirmée par 5' RACE à l'aide des oligonucléotides HNII-2 et HNII-3, spécifiques à l'humain. De même, les oligonucléotides HNII-1 et HNII-2 permettront l'amplification de la région 3' par la technique de 3' RACE.

HNII-1 5'- CGG CCT GGA TCT CAC CCA TGA G - 3' (SEQ ID n°24)

25 HNII-2 5'- CTG ACT GCT CCC GGA AGT GCT GGG TG - 3' (SEQ ID n°25)

HNII-3 5'- GAG CAG CTC TTC TTG ATC - 3' (SEQ ID n°26)

HNII-4 5'- CTC CAC CAA TCC ATC ATG TTG C - 3' (SEQ ID n°27).

EXEMPLE 4 :**Expression tissulaire de NEP II**

Des études de Northern-blot et de RT-PCR montrent que NEP II est codé par un transcrit de 2,8 Kb très fortement exprimé dans les testicules de rat et, modérément, dans le cœur, le foie, le système digestif et le cerveau. Des études de RT-PCR semi-quantitatives montrent un profil d'expression similaire dans ces tissus ainsi qu'une prédominance des formes longues.

Toutes ces caractéristiques indiquent clairement que la protéine identifiée pour la première fois est une métalloprotéase membranaire (ectoprotéase) responsable du métabolisme de peptides messagers neuronaux et/ou hormonaux.

Le polypeptide NEP II natif est exprimé de manière hétérogène dans le système nerveux, les glandes (hypophyse, testicule), l'appareil digestif (intestin grêle notamment), l'appareil cardiovasculaire (cœur notamment).

Les techniques d'hybridation *in situ* indiquent en outre une forte expression de la protéine NEP II dans les neurones et les cellules adénohypophysaires exprimant le gène de la POMC (propiomélanocortine), précurseur de l'ACTH.

Ces localisations indiquent la participation de NEP II dans la protéolyse d'hormones et de neurotransmetteurs peptidergiques ou de leurs précurseurs émanant de ou agissant sur ces divers organes. Il devient dès lors intéressant dans un but thérapeutique d'affecter les transmissions peptidergiques correspondantes en inhibant NEP II.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi la séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ou un fragment biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n°2 ou SEQ ID n° 4, ledit polypeptide isolé étant désigné par «NEP II ».
2. Acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n°1 ou SEQ ID n° 3, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°1 ou n° 3, ou leurs séquences complémentaires.
3. Sonde oligonucléotidique hybridant spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde ayant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID n°5 à SEQ ID n°27.
4. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 2.
5. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 4.
6. Anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1 administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon la revendication 1.
7. Procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :
 - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon la revendication 6 ;
 - détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

8. Procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :

- préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;
- mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde pouvant être notamment une sonde oligonucléotidique selon la revendication 3;
- 10 - détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde, indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.

9. Procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés, éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la 15 coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés substrats.

10. Procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- 20 - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon le procédé de la revendication 9, ledit composé substrat étant éventuellement marqué;
- évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de 25 l'activité métalloprotéasique de NEP II.

11. Procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

30 12. Procédé de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon le procédé de la revendication 9 ou avec un composé inhibiteur de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage de la revendication 11, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué ;
 - détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.
13. Utilisation du polypeptide NEP II selon la revendication 1 pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.
14. Utilisation selon la revendication 13 dans laquelle lesdits troubles sont choisis parmi les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affections endocriniennes.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM

<120> Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie

<130> BET 99/0150

<140>

<141>

<150> FR/9804389

<151> 1998-04-08

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2765

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> CDS

<222> (107) ... (2428)

<400> 1

GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TGCTCAAGGC ATCCAAGCTC CAGCTGCCTC CCTCCTGGCC 60

CTGGCCCTGG GTGCTCAGCT GTGTGCCTTC CACCCAGAAC CGGCTG ATG GGG AAG 115
Met Gly Lys
1TCG GAG AGC TCA GTG GGG ATG ATG GAG AGA GCG GAC AAC TGT GGG AGG 163
Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn Cys Gly Arg
5 10 15AGG CGC CTA GGC TTC GTG GAG TGT GGG CTG CTG GTA CTG CTG ACA CTG 211
Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu Leu Thr Leu
20 25 30 35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CTG TTG ATG GGA GCC ATA GTG ACT CTG GGT GTC TTC TAC AGC ATA GGG Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr Ser Ile Gly	259
40 45 50	
AAG CAG CTG CCC CTC TTA AAT AGC CTG CTG CAC GTC TCC CGG CAT GAG Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser Arg His Glu	307
55 60 65	
AGG ACG GTT GTA AAA CGA GTC CTC AGA GAT TCA TCG CAG AAG AGT GAC Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln Lys Ser Asp	355
70 75 80	
ATC TGT ACT ACC CCA AGC TGC GTG ATA GCA GCT GCC AGA ATC CTC CAG Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg Ile Leu Gln	403
85 90 95	
AAC ATG GAC CAG TCA AAG AAA CCC TGC GAC AAC TTC TAT CAG TAT GCT Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr Gln Tyr Ala	451
100 105 110 115	
TGC GGA GGC TGG CTA CGG CAC CAT GTG ATC CCC GAG ACC AAC TCC AGA Cys Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr Asn Ser Arg	499
120 125 130	
TAC AGC GTC TTT GAC ATC CTT CGG GAT GAG CTG GAG GTC ATC CTC AAA Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val Ile Leu Lys	547
135 140 145	
GGG GTG CTG GAG GAT TCC TCT GTC CAG CAC CGC CCA GCT GTG GAG AAG Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala Val Glu Lys	595
150 155 160	
GCC AAG ACA CTG TAC CGC TCC TGC ATG AAC CAG AGT GTG ATA GAG AAG Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val Ile Glu Lys	643
165 170 175	
AGA GAC TCT GAG CCC CTG CTG AAC GTC TTA GAT ATG ATA GGA GGT TGG Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile Gly Gly Trp	691
180 185 190 195	
CCT GTA GCC ATG GAC AAG TGG AAT GAG ACC ATG GGC CCC AAG TGG GAA	739

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pro Val Ala Met Asp Lys Trp Asn Glu Thr Met Gly Pro Lys Trp Glu			
200	205	210	
CTG GAG CGG CAG TTG GCT GTG TTG AAC TCG CAG TTC AAC AGG CGC GTC		787	
Leu Glu Arg Gln Leu Ala Val Leu Asn Ser Gln Phe Asn Arg Arg Val			
215	220	225	
CTC ATC GAC CTC TTC ATC TGG AAT GAT GAC CAG AAC TCC AGC CGG CAC		835	
Leu Ile Asp Leu Phe Ile Trp Asn Asp Asp Gln Asn Ser Ser Arg His			
230	235	240	
GTC ATC TAC ATA GAC CAG CCC ACC TTG GGC ATG CCC TCC CGG GAG TAC		883	
Val Ile Tyr Ile Asp Gln Pro Thr Leu Gly Met Pro Ser Arg Glu Tyr			
245	250	255	
TAT TTC AAG GAA GAC AGC CAC CGG GTA CGG GAA GCC TAC CTG CAG TTC		931	
Tyr Phe Lys Glu Asp Ser His Arg Val Arg Glu Ala Tyr Leu Gln Phe			
260	265	270	275
ATG ACA TCA GTG GCC ACT ATG CTG AGG AGA GAC CTG AAC CTG CCC GGG		979	
Met Thr Ser Val Ala Thr Met Leu Arg Arg Asp Leu Asn Leu Pro Gly			
280	285	290	
GAG ACC GAT TTG GTG CAG GAG GAA ATG GCA CAG GTG CTG CAT CTG GAG		1027	
Glu Thr Asp Leu Val Gln Glu Glu Met Ala Gln Val Leu His Leu Glu			
295	300	305	
ACA CAT CTG GCC AAC GCC ACG GTC CCC CAG GAG AAA AGG CAT GAT GTC		1075	
Thr His Leu Ala Asn Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Arg His Asp Val			
310	315	320	
ACC GCC CTG TAT CAC CGA ATG GGC CTG GAG GAG CTG CAG GAA AGG TTT		1123	
Thr Ala Leu Tyr His Arg Met Gly Leu Glu Glu Leu Gln Glu Arg Phe			
325	330	335	
GGT CTG AAG GGG TTT AAC TGG ACT CTC TTC ATA CAA AAC GTG CTG TCT		1171	
Gly Leu Lys Gly Phe Asn Trp Thr Leu Phe Ile Gln Asn Val Leu Ser			
340	345	350	355
TCT GTG CAA GTT GAG CTG CTC CCG AAT GAG GAG GTG GTG GTC TAT GGC		1219	
Ser Val Gln Val Glu Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Val Val Tyr Gly			
360	365	370	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ATC CCC TAC CTG GAG AAT CTT GAG GAG ATC ATT GAC GTC TTC CCA GCA Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val Phe Pro Ala 375 380 385	1267
CAG ACC TTG CAA AAC TAC CTG GTG TGG CGC CTG GTG CTA GAT CGC ATC Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu Asp Arg Ile 390 395 400	1315
GGC AGC CTG AGC CAG AGA TTC AAA GAA GCG CGT GTG GAC TAC CGC AAG Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp Tyr Arg Lys 405 410 415	1363
GCG CTG TAC GGT ACA ACC ATG GAG GAA GTA CGC TGG CGG GAG TGT GTC Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg Glu Cys Val 420 425 430 435	1411
AGC TAT GTC AAC AGC AAC ATG GAG AGT GCC GTG GGC TCC CTC TAC ATC Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser Leu Tyr Ile 440 445 450	1459
AAG CGG GCC TTC TCC AAG GAC AGC AAG AGC ATA GTC AGT GAG CTT ATC Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser Glu Leu Ile 455 460 465	1507
GAG AAG ATA CGG TCC GTG TTT GTG GAT AAC CTG GAC GAG TTG AAC TGG Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu Leu Asn Trp 470 475 480	1555
ATG GAT GAG GAA TCC AAG AAA AAG GCC CAG GAA AAG GGC TTG AAT ATC Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala Leu Asn Ile 485 490 495	1603
CGG GAA CAG ATC GGC TAC CCT GAC TAC ATT TTG GAA GAC AAT AAC AGA Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp Asn Asn Arg 500 505 510 515	1651
CAC CTG GAT GAG GAA TAC TCC AGT CTG ACT TTC TCA GAG GAC CTG TAT His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asp Leu Tyr 520 525 530	1699
TTT GAG AAC GGG CTT CAG AAC CTC AAG AAC AAT GCC CAA AGG AGC CTC	1747

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Phe Glu Asn Gly Leu Gln Asn Leu Lys Asn Asn Ala Gln Arg Ser Leu		
535	540	545
AAG AAA CTT CGG GAA AAG GTG GAC CAG AAT CTC TGG ATC ATT GGG GCT		1795
Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Gln Asn Leu Trp Ile Ile Gly Ala		
550	555	560
GCA GTG GTC AAT GCA TTC TAC TCC CCA AAC AGA AAC CTG ATC GTC TTT		1843
Ala Val Val Asn Ala Phe Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Leu Ile Val Phe		
565	570	575
CCA GCG GGG ATC CTC CAG CCA CCC TTC TTC AGC AAG GAC CAA CCA CAG		1891
Pro Ala Gly Ile Leu Gln Pro Pro Phe Phe Ser Lys Asp Gln Pro Gln		
580	585	590
595		
GCC TTG AAT TTC GGG GGC ATC GGG ATG GTG ATT GGA CAC GAG ATC ACA		1939
Ala Leu Asn Phe Gly Gly Ile Gly Met Val Ile Gly His Glu Ile Thr		
600	605	610
CAC GGC TTT GAT GAT AAC GGT CGG AAC TTT GAC AAG AAT GGC AAC ATG		1987
His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp Lys Asn Gly Asn Met		
615	620	625
CTG GAC TGG TGG AGC AAC TTC TCG GCC CGG CAC TTC CGA CAG CAG TCA		2035
Leu Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Ala Arg His Phe Arg Gln Gln Ser		
630	635	640
CAG TGT ATG ATT TAT CAG TAC AGC AAC TTC TCT TGG GAA CTA GCA GAC		2083
Gln Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Ser Asn Phe Ser Trp Glu Leu Ala Asp		
645	650	655
AAC CAG AAT GTG AAC GGA TTC AGC ACC CTC GGG GAG AAC ATC GCC GAC		2131
Asn Gln Asn Val Asn Gly Phe Ser Thr Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp		
660	665	670
675		
AAC GGC GGT GTG CGG CAG GCA TAC AAG GCT TAC CTA CAG TGG CTA GCT		2179
Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln Trp Leu Ala		
680	685	690
GAA GGC GGC AGA GAC CAG AGA CTG CCG GGA CTG AAC CTG ACC TAT GCT		2227
Glu Gly Gly Arg Asp Gln Arg Leu Pro Gly Leu Asn Leu Thr Tyr Ala		
695	700	705

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CAG CTT TTC TTC ATT AAC TAT GCC CAG GTG TGG TGT GGG TCC TAC AGG Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp Cys Gly Ser Tyr Arg 710 715 720	2275
CCG GAG TTC GCC ATC CAG TCC ATC AAG ACA GAT GTC CAC AGT CCT CTT Pro Glu Phe Ala Ile Gln Ser Ile Lys Thr Asp Val His Ser Pro Leu 725 730 735	2323
AAG TAC AGG GTG CTG GGC TCA CTA CAG AAC CTA CCA GGC TTC TCT GAG Lys Tyr Arg Val Leu Gly Ser Leu Gln Asn Leu Pro Gly Phe Ser Glu 740 745 750 755	2371
GCG TTC CAC TGC CCA CGA GGC AGC CCC ATG CAC CCT ATG AAT CGA TGT Ala Phe His Cys Pro Arg Gly Ser Pro Met His Pro Met Asn Arg Cys 760 765 770	2419
CGC ATC TGG TAGCCAAGGC TGAGCTATGC TGCGGCCAC GCCCGCCAC Arg Ile Trp	2468
CCAGAGGCTT CGTGAATGGT GTAGCCGGCA TAGATGTGCA GGTTGTTGCC TGAAGGCCAC TGGAGCCACC AGCCAGCCCT CCGCGCCCAG CCTAGAGGGC AGCCACCCGC CCACATCTGG	2528
GATGAGTGGT GGTGCCTGGT CCTGCGCCTT TTCCGGCCAG TGAGGGTCAG CGGCCCGGTA	2588
GGAGCAGTCA GCTGTCCCCC ACCCTCTTCA TAGTGTGTGG CTAAATGTCC TCGAGCTTCA	2648
GACTTGAGCT AAGTAAACGC TTCAAAGAAG GCAAAAAAAA AAAAAAAA AAAAGGG	2708
	2765

<210> 2
<211> 774
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 2
Met Gly Lys Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn
1 5 10 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cys Gly Arg Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu
20 25 30

Leu Thr Leu Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr
35 40 45

Ser Ile Gly Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser
50 55 60

Arg His Glu Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln
65 70 75 80

Lys Ser Asp Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg
85 90 95

Ile Leu Gln Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr
100 105 110

Gln Tyr Ala Cys Gly Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr
115 120 125

Asn Ser Arg Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val
130 135 140

Ile Leu Lys Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala
145 150 155 160

Val Glu Lys Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val
165 170 175

Ile Glu Lys Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile
180 185 190

Gly Gly Trp Pro Val Ala Met Asp Lys Trp Asn Glu Thr Met Gly Pro
195 200 205

Lys Trp Glu Leu Glu Arg Gln Leu Ala Val Leu Asn Ser Gln Phe Asn
210 215 220

Arg Arg Val Leu Ile Asp Leu Phe Ile Trp Asn Asp Asp Gln Asn Ser
225 230 235 240

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Arg His Val Ile Tyr Ile Asp Gln Pro Thr Leu Gly Met Pro Ser
245 250 255

Arg Glu Tyr Tyr Phe Lys Glu Asp Ser His Arg Val Arg Glu Ala Tyr
260 265 270

Leu Gln Phe Met Thr Ser Val Ala Thr Met Leu Arg Arg Asp Leu Asn
275 280 285

Leu Pro Gly Glu Thr Asp Leu Val Gln Glu Glu Met Ala Gln Val Leu
290 295 300

His Leu Glu Thr His Leu Ala Asn Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Arg
305 310 315 320

His Asp Val Thr Ala Leu Tyr His Arg Met Gly Leu Glu Glu Leu Gln
325 330 335

Glu Arg Phe Gly Leu Lys Gly Phe Asn Trp Thr Leu Phe Ile Gln Asn
340 345 350

Val Leu Ser Ser Val Gln Val Glu Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Val
355 360 365

Val Tyr Gly Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val
370 375 380

Phe Pro Ala Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu
385 390 395 400

Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp
405 410 415

Tyr Arg Lys Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg
420 425 430

Glu Cys Val Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser
435 440 445

Leu Tyr Ile Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser
450 455 460

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu Leu Ile Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu
465 470 475 480

Leu Asn Trp Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala
485 490 495

Leu Asn Ile Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp
500 505 510

Asn Asn Arg His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu
515 520 525

Asp Leu Tyr Phe Glu Asn Gly Leu Gln Asn Leu Lys Asn Asn Ala Gln
530 535 540

Arg Ser Leu Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Gln Asn Leu Trp Ile
545 550 555 560

Ile Gly Ala Ala Val Val Asn Ala Phe Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Leu
565 570 575

Ile Val Phe Pro Ala Gly Ile Leu Gln Pro Pro Phe Phe Ser Lys Asp
580 585 590

Gln Pro Gln Ala Leu Asn Phe Gly Gly Ile Gly Met Val Ile Gly His
595 600 605

Glu Ile Thr His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp Lys Asn
610 615 620

Gly Asn Met Leu Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Ala Arg His Phe Arg
625 630 635 640

Gln Gln Ser Gln Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Ser Asn Phe Ser Trp Glu
645 650 655

Leu Ala Asp Asn Gln Asn Val Asn Gly Phe Ser Thr Leu Gly Glu Asn
660 665 670

Ile Ala Asp Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln
675 680 685

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Trp Leu Ala Glu Gly Gly Arg Asp Gln Arg Leu Pro Gly Leu Asn Leu
690 695 700

Thr Tyr Ala Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp Cys Gly
705 710 715 720

Ser Tyr Arg Pro Glu Phe Ala Ile Gln Ser Ile Lys Thr Asp Val His
725 730 735

Ser Pro Leu Lys Tyr Arg Val Leu Gly Ser Leu Gln Asn Leu Pro Gly
740 745 750

Phe Ser Glu Ala Phe His Cys Pro Arg Gly Ser Pro Met His Pro Met
755 760 765

Asn Arg Cys Arg Ile Trp
770

<210> 3

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

GGGCACGAGA TCACGCACGG CTTTGATGAC AATGGCCGGA ACTTCGACAA GAATGGCAAC 60

ATGATGGATT GGTGGAGTAA CTTCTCCACC CAGCACTTCC GGGAGCAGTC AGAGTGCATG 120

ATCTACCACT ACGGCAACTA CTCCTGGAC CTGGCAGACG AACAGAACGT GAACGGATTG 180

AACACCCCTTG GGGAAAACAT TGCTGACAAC GGAGGGGTGC GGCAAGCCTA TAAGGCCTAC 240

CTCAAGTGGA TGGCAGAGGG TGGCAAGGAC CAGCAGCTGC CCGGCCTGGA TCTCACCCAT 300

GAGCAGCTCT TCTTCATCAA CTATGCC 327

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 4
 Gly His Glu Ile Thr His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp
 1 5 10 15
 Lys Asn Gly Asn Met Met Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Thr Gln His
 20 25 30
 Phe Arg Glu Gln Ser Glu Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Gly Asn Tyr Ser
 35 40 45
 Trp Asp Leu Ala Asp Glu Gln Asn Val Asn Gly Phe Asn Thr Leu Gly
 50 55 60
 Glu Asn Ile Ala Asp Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Trp Met Ala Glu Gly Lys Asp Gln Gln Leu Pro Gly Leu
 85 90 95
 Asp Leu Thr His Glu Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp
 100 105 110
 Cys Gly Cys Lys
 115

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 5
TGGAGCGGCA GTTGGCTGTG

20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 6
AGTTCCCACT TGGGGCCCAT G

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 7
GCTGGAGGAT TCCTCTGTCC

20

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 8
CGGGGATCAC ATGGTGCCG

19

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 9
CTACCCCCAAG CTGCGTGATA G

21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 10
CGGCACCATG TGATCCCCGA G

21

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 11
GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TG

22

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 12
GGTCATCATT CCAGATGAAG AG

22

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 13
CGATGAGGAC GCGCCTGTTG

20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 14
TGCAGGAAAG GTTTGGTCTG

20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 15
GAACGCCTCA GAGAAGCCTG

20

<210> 16
<211> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 16
ATGACCAGAA CTCCAGCCGG

20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 17
CATCATGCTT TTTCTCCTGG G

21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 18
CCCGAAGTTT CTTGAGGCTC C

21

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 19
GATCGGCTAC CCTGACTAC

19

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

GTTCGCCATC CAGTCCATC

19

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 21
CGAACGCCTAG GCGCCTCCTC

20

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 22
cgagatcaca catggctttg atga

24

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 23
ggaccccacac cacacctg

18

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> séquence artificielle
<223> oligonucléotide

<400> 24
cggcctggat ctcacccatg ag

22

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> séquence artificielle

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> oligonucléotide

<400> 25

ctgactgctc ccggaaagtgc tgggtg

26

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<223> oligonucléotide

<400> 26

gagcagctct tcttcatc

18

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<223> oligonucléotide

<400> 27

ctccaccaat ccatcatgtt gc

22

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<223> séquence protéique correspondant à la sonde oligonucléotidique SEQ ID n°22

<400> 28

Glu Ile Thr His Phe Asp

1

5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<223> séquence protéique correspondant à la sonde oligonucléotidique SEQ ID n°23

<400> 29

Gln Val Trp Cys Gly Ser

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/00807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	C12N15/57	C12N9/64	C12N5/10	C07K16/40	G01N33/573
	C12Q1/68	C12Q1/37			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 272 928 A (GENENTECH INC) 29 June 1988	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 1999

Date of mailing of the international search report

08/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaaf, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 99/00807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
EP 0272928	A 29-06-1988	US AT AU AU AU AU DE DE DK EP EP ES IE IL JP JP US CA DE DE DK	4960700 119936 616876 8305787 623845 8305887 3751169 3751169 684087 0272929 0596355 2072251 66333 84928 1172344 2685468 5780025 1322160 3751748 3751748 684487	A T B A B A D T A A A T B B A A A D T A A A A	02-10-1990 15-04-1995 14-11-1991 30-06-1988 28-05-1992 30-06-1988 20-04-1995 26-10-1995 03-10-1988 29-06-1988 11-05-1994 16-07-1995 27-12-1995 27-02-1994 07-07-1989 03-12-1997 14-07-1998 14-09-1993 25-04-1996 14-11-1996 07-10-1990

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
PCT/FR 99/00807

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/57 C12N9/64
C12Q1/68 C12Q1/37

C12N5/10

C07K16/40

G01N33/573

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 272 928 A (GENENTECH INC) 29 juin 1988	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Ande Internationale No

PCT/FR 99/00807

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0272928 A	29-06-1988	US 4960700 A	02-10-1990
		AT 119936 T	15-04-1995
		AU 616876 B	14-11-1991
		AU 8305787 A	30-06-1988
		AU 623845 B	28-05-1992
		AU 8305887 A	30-06-1988
		DE 3751169 D	20-04-1995
		DE 3751169 T	26-10-1995
		DK 684087 A	03-10-1988
		EP 0272929 A	29-06-1988
		EP 0596355 A	11-05-1994
		ES 2072251 T	16-07-1995
		IE 66333 B	27-12-1995
		IL 84928 A	27-02-1994
		JP 1172344 A	07-07-1989
		JP 2685468 B	03-12-1997
		US 5780025 A	14-07-1998
		CA 1322160 A	14-09-1993
		DE 3751748 D	25-04-1996
		DE 3751748 T	14-11-1996
		DK 684487 A	07-10-1990

TRAITE D' COOPERATION EN MATIERS DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 novembre 1999 (29.11.99)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 99/0150
Demande internationale no. PCT/FR99/00807	Date de priorité (jour/mois/année) 08 avril 1998 (08.04.98)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 avril 1999 (07.04.99)	
Déposant OUIMET, Tanja etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

02 novembre 1999 (02.11.99)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 18 JUL 2000
WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 99/0150	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR99/00807	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 08/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/57		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 02/11/1999	Date d'achèvement du présent rapport 11.07.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Predazzi, V N° de téléphone +49 89 2399 7518



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00807

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initiallement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-13 version initiale

Revendications, N°:

1-14 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 3 et 7-14 Non : Revendications 1, 2 et 4-6
Activité inventive	Oui : Revendications 3 et 7-14 Non : Revendications 1, 2 et 4-6
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-14 Non : Revendications

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00807

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point I

Base de l'opinion

La présente demande comprend une liste de séquences de SEQ ID n°1 à SEQ ID n°29.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l' article 35 (2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. L'objet des revendications 1, 2 et 4-6 n'est pas conforme au critère de nouveauté défini par l'Article 33 (2) PCT.

Concernant la revendication 1 de la présente demande, un fragment biologiquement actif des séquences SEQ ID n° 1 ou 4, peut-être aussi représenté par un nucléotide choisi au hasard, par conséquent l'objet de cette revendication n'est pas nouveau.

Le même raisonnement s'applique aux revendications 2 et 4-6 dont l'objet de la protection est très vague et peut être représenté, pour la revendication 2 par n'importe quelle séquence, pour la revendication 4 par n'importe quel vecteur, pour la revendication 5 par n'importe quelle cellule hôte et pour la revendication 6 par n'importe quel anticorps.

Compte tenu de cette objection, l'attention du Demandeur est attirée sur le fait que la nouveauté des revendications qui réfèrent aux revendications 1, 2, et 4-6 pourrait aussi être compromises.

2. Dans le cas où Demandeur modifierait ses revendications en tenant compte de l'objection mentionnée au paragraphe 1, la présente demande remplirait alors les conditions énoncées dans l'Article 33 (2) (3) PCT, l'objet des revendications 1-14 étant conforme au critère de nouveauté et de activité inventive définies par l'Article 33 (2) (3) PCT.

En fait, selon l'examen fait par la division de la recherche, l'état de la technique, ne donne pas d'indications précises qui auraient pu conduire la personne du métier à concevoir et réaliser l'objet des revendications 1-14. Par conséquent

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ces revendications seraient nouvelles et inventives et satisfairaient ainsi les exigences de l' Article 33 (2) et (3) PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

Les termes ayant un sens relatif, comme "dérivée" et "homologue", utilisés dans les revendications 1 et 2, et comme "fragment biologiquement actif" utilisé dans la revendication 1, sont vagues et équivoques, et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. Le Demandeur est prié de modifier dites revendications en introduisant une claire et épreuvable caractéristique fonctionnelle définissant l'object au quel elles se réfèrent.

L'objet des dites revendications n'est donc pas clairement défini (Article 6 PCT). Une objection similaire peut aussi être soulevée à l'encontre du terme "NEPIL" utilisé dans les revendications 1, 7-13 qui n'a pas de signification bien établie et reconnue.

Ceci s'applique aussi, par conséquent, aux revendications qui se réfèrent directement ou indirectement aux revendications 1, 2, 7-13, c'est-à-dire aux revendications 3-6 et 14.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 99/0150	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 00807	Date du dépôt international(jour/mois/année) 07/04/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 08/04/1998
Déposant		
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. **Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
 - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
 - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des **dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)